昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*，February 2006，49（1）：34－37　ISSN 0454-6296

长角血蜱雌蜱感染嗜菌异小杆线虫后血淋巴的变化

高志华[1]，杨小龙[1]，刘敬泽[1*]，简　恒[2]
（1. 河北师范大学生命科学学院，石家庄　050016；2. 中国农业科学院生物防治研究所，北京　100081）

摘要：**用嗜菌异小杆线虫** *Heterorhabditis bacteriophora* E-6-7（Hb E-6-7）**感染长角血蜱** *Haemaphysalis longicornis* **雌蜱，测定感染后雌蜱血淋巴总蛋白含量、酯酶活性及酯酶同工酶的变化，以探讨昆虫病原线虫对蜱的致病机理。结果显示，雌蜱血淋巴总蛋白含量在** Hb E-6-7 **感染后** 12 h **显著增加，达到最大值** 92.21 μg/μL；**在感染后** 24 h **明显下降**（49.06 μg/μL），**至感染后** 48 h **降至** 34.25 μg/μL。**雌蜱血淋巴酯酶活性在线虫感染后** 0～12 h **内无显著变化；在感染** 24 h **后迅速增加**（$OD_{24h} = 0.1840$，$OD_{36h} = 0.1940$，$OD_{48h} = 0.2165$），**与对照组差异显著。**PAGE **结果表明，线虫感染后导致雌蜱血淋巴酯酶同工酶电泳图谱发生变化，主要为电泳图谱两端** a **带和** b **带的消失以及一条** c **带的增加。上述结果表明，长角血蜱雌蜱被** Hb E-6-7 **感染后其血淋巴总蛋白含量和酯酶发生变化，这种变化可能与蜱的防御和对昆虫病原线虫的适应有关。**

关键词：**长角血蜱；嗜菌异小杆线虫；致病机理；血淋巴；总蛋白含量；酯酶活性**
中图分类号：Q965　　文献标识码：A　　文章编号：0454-6296（2006）01-0034-04

Changes in the hemolymph of female *Haemaphysalis longicornis* Neumann (Acari：Ixodidae) after infection by *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda：Heterorhabditidae)

GAO Zhi-Hua[1]，YANG Xiao-Long[1]，LIU Jing-Ze[1*]，JIAN Heng[2]（1. College of Life Sciences，Hebei Normal University，Shijiazhuang 050016，China；2. Institute of Biological Control，Chinese Academy of Agricultural Sciences，Beijing 100081，China）

Abstract：For increasing our knowledge on the pathology of entomopathogenic nematodes to ticks，the changes of total protein level，esterase activity and esterase bands in the hemolymph of female *Haemaphysalis longicornis* Neumann after infection by the nematode *Heterorhabditis bacteriophora* E-6-7（Hb E-6-7）were detected. The results showed that in 12 h after infection，the total protein in the hemolymph increased sharply to a maximum（92.21 μg/μL）and declined later，to 49.06 μg/μL in 24 h after infection and 34.25 μg/μL in 48 h after infection. The female esterase activity in the hemolymph showed no significant change during 0－12 h after infection，and it rapidly increased from 24 h after infection（$OD_{24h} = 0.1840$，$OD_{36h} = 0.1940$，$OD_{48h} = 0.2165$），showing significant difference with the control. PAGE analysis revealed that nematode infection resulted in the change of esterase electrophoresis profile，mainly with the bands a and b disappeared and a new band c appeared. The above results indicated that Hb E-6-7 infection could cause the changes of total protein and esterase in the hemolymph of female *H. longicornis*，and these changes might be related to the resistance and adaptation of ticks to entomopathogenic nematodes.

Key words：*Haemaphysalis longicornis*；*Heterorhabditis bacteriophora*；pathology；hemolymph；total protein content；esterase activity

昆虫病原线虫是害虫生物防治中一个重要的因子，某些线虫已商品化，其优点在于：线虫宿主范围广，可防治多种害虫；易于人工大量繁殖；操作简单，用常规的喷洒或冲洗技术即可施用；线虫能主动寻

基金项目：河北省自然科学基金项目（300168）；河北师范大学基金项目（L2003Q12）
作者简介：高志华，女，1977 年 9 月生，河北鹿泉人，硕士，研究方向为动物生态学，E-mail：gaozhihua77@sina.com
* **通讯作者** Author for correspondence，E-mail：jzliu21@heinfo.net
收稿日期 Received：2005-01-31；**接受日期** Accepted：2005-04-14

找宿主；体内携带共生菌，具有高的杀虫能力；对环境安全；线虫可与一些杀虫剂混和使用（Kaya and Gaugler，1993）。

昆虫病原线虫对靶标昆虫的作用已有较多报道。当线虫自由活动的3龄感染期幼虫（infective juveniles，IJs）遇到合适的宿主后，通过酶解和机械作用进入害虫体腔（Abuhatab *et al*.，1995），释放共生菌（Forst *et al*.，1997）而杀死害虫。在害虫体内，线虫以快速繁殖的共生菌为食，逐渐成熟、交配、产生更多的感染期幼虫。已知昆虫病原线虫能有效杀死斜纹贪夜蛾 *Spodoptera litura*（Narayanan and Gopalkrishnana，1987）、甘蔗大褐齿爪鳃金龟 *Holotrichia consanguinea*（Vyas and Yadav，1993）和棉铃虫 *Helicoverpa armigera*（Patel and Vyas，1995）。

蜱类隶属节肢动物门、蛛形纲、蜱螨亚纲、寄螨目，与昆虫有较近的亲缘关系。有关昆虫病原线虫对蜱的作用则了解甚少。已报道环形牛蜱 *Boophilus annulatus* 对线虫有高的敏感性（Samish and Glazer，1991），肩突硬蜱 *Ixodes scapularis* 对斯氏线虫有很强的敏感性（Zhioua *et al*.，1995；Hill，1998）。高志华等（2004）报道5种线虫对长角血蜱 *Haemaphysalis longicornis* Neumann 雌蜱有致死效应，其中嗜菌异小杆线虫 *Heterorhabditis bacteriophora* E-6-7（Hb E-6-7）导致的雌蜱死亡率最高。作者在上述研究基础上从生化水平研究了 Hb E-6-7 对长角血蜱雌蜱的作用，以期阐明昆虫病原线虫对蜱类的致病机理。

1　材料与方法

1.1　蜱的来源与喂养

长角血蜱吸血若蜱采自河北省小五台山国家级自然保护区杨家坪管理区羊体上，在实验室光照培养箱26±1℃，75% RH，光周期6L∶18D中培养。饥饿幼蜱、若蜱和成蜱均在兔耳上饱血，饱血后放入光照培养箱中，条件同上。

1.2　昆虫病原线虫

嗜菌异小杆线虫在大蜡螟 *Galleria mellonella* 末龄幼虫中繁育，所得线虫3龄幼虫贮存在有湿海绵的塑料袋中存放（10℃），感染前于26℃放置24 h后用于感染蜱的实验。

1.3　血淋巴采集与总蛋白测定

将吸血3天的雌蜱从兔耳上取下，用微量进样器自雌蜱体壁后缘注射线虫 Hb E-6-7 悬浮液（约200 IJs/20 μL）4 μL，未注射空白组（对照1）和注射等量蒸馏水（对照2）为相同条件下培养的雌蜱。在处理后不同时间（0、12、24、36和48 h）切断雌蜱附肢基部取血淋巴，定量毛细管收集后迅速放入预冷的缓冲液（pH 8.0，含0.01 mol/L Tris-HCl、0.02 mol/L EGTA、少量的PMSF和苯基硫脲晶粒）中，冻存于冰箱中备用。每个处理用5只蜱取6 μL血淋巴，Tris-HCl缓冲液稀释，作为待测样品。以Bradford（1976）法测定样品中总蛋白浓度。实验重复4次。

1.4　血淋巴酯酶活性测定

各试管中分别加入1 mL 0.01 mol/L的α-乙酸萘酯，再加入3 mL重蒸水稀释，取各组（注射线虫组、对照1和对照2）不同处理时间的待测样品50 μL分别加入上述试管，振荡5 min（用50 μL重蒸水代替新鲜血样做空白调零），立即加入5滴坚牢蓝RR盐显色剂显色，用分光光度计读取600 nm处光吸收值（OD值），比较酯酶活性。每处理重复4次。

1.5　线虫感染对血淋巴酯酶同工酶的影响

用毛细管收集雌蜱血淋巴，迅速放入预冷的缓冲液（pH 8.0，含0.01 mol/L Tris-HCl、0.02 mol/L EGTA和少量的PMSF）中。PAGE凝胶浓度分别为5%浓缩胶和10%分离胶，浓缩胶稳压200 V，分离胶稳压300 V，电泳在层析冷柜中进行。取下凝胶，用坚牢蓝RR盐显色剂37℃箱中显色至酶带出现，倒去显色液，水冲洗2～3次，7%的冰醋酸固定。PAGE电泳后观察实验结果。实验重复6次。

2　结果与分析

2.1　线虫感染后雌蜱血淋巴总蛋白含量的变化

由图1可知，对照1和对照2雌蜱血淋巴总蛋白含量相对较稳定，随时间推移有小幅度升高。不同处理时间，对照1与对照2总蛋白含量有一定差别，但无显著差异（$P > 0.05$）。注射线虫初期雌蜱血淋巴蛋白含量为30.22 μg/μL，与2个对照组无显著差异（$P > 0.05$）；线虫感染后12 h蛋白含量迅速增加，达到峰值（92.21 μg/μL），极显著高于同时间对照组（$P < 0.01$）；之后蛋白含量迅速下降，24 h时为49.06 μg/μL；48 h时降至低值（34.25 μg/μL）。

2.2　线虫感染后雌蜱血淋巴酯酶活性的变化

在0～48 h内，对照1与同时间对照2雌蜱血淋巴酯酶活性无显著差异（$P > 0.05$）（表1）。Hb E-6-7感染后，血淋巴酯酶活性在前12 h与对照组无显著差异（$OD_{0h} = 0.0508$，$OD_{12h} = 0.0908$）；24 h时酯酶活性（$OD_{24h} = 0.1840$）显著高于对照组（$P < 0.05$）；36 h

时继续升高（OD_{36h} = 0.1940）；48 h 时酯酶活性（OD_{48h} = 0.2165）约为对照组的 1.6 倍（表 1）。

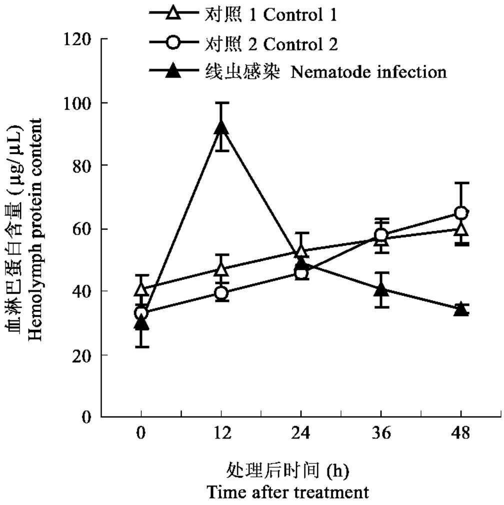

图 1　Hb E-6-7 对长角血蜱雌蜱血淋巴蛋白含量的影响

Fig. 1　Effects of Hb E-6-7 on the hemolymph protein level of female *Haemaphysalis longicornis*

对照 1 Control 1：**未注射空白对照** Control without injection；**对照** 2 Control 2：**注射** 4 μL **蒸馏水** Injected with 4 μL distilled water；**线虫感染** Nematode infection：**注射** 4 μL Hb E-6-7 **悬浮液（约** 200 IJs/20 μL） Injected with 4 μL Hb E-6-7 suspension (about 200 IJs/20 μL). **表** 1 **同** The same for Table 1.

表 1　**Hb E-6-7** 感染对长角血蜱雌蜱血淋巴酯酶活性的影响（OD_{600} 值）

Table 1　Effects of Hb E-6-7 infection on esterase activity in the hemolymph of female *Haemaphysalis longicornis* (OD_{600} value)

处理后时间 Time after treatment (h)	**对照** 1 Control 1	**对照** 2 Control 2	**线虫感染** Nematode infection
0	0.0675 ± 0.0157	0.0583 ± 0.0068	0.0508 ± 0.0036
12	0.0763 ± 0.0095	0.0930 ± 0.0079	0.0908 ± 0.0116
24	0.0940 ± 0.0067	0.1098 ± 0.0166	0.1840 ± 0.0046 *
36	0.1095 ± 0.0102	0.1185 ± 0.0055	0.1940 ± 0.0100 *
48	0.1305 ± 0.0059	0.1360 ± 0.0069	0.2165 ± 0.0231 *

表中数据为平均值 ± 标准误（n = 4）；* 示对照与处理相比差异显著（$P < 0.05$）。 Data in the table are mean ± *SE* (n = 4); * Showing significant difference between the treatment and the controls in the same row ($P < 0.05$).

2.3　线虫感染后雌蜱血淋巴酯酶同工酶的变化

PAGE **结果显示，对照** 1 **的电泳图谱（图略）与对照** 2 **的一致。对照** 2 **长角血蜱雌蜱血淋巴酯酶同工酶随时间变化较为复杂，其中** a **带和** b **带为较稳定的** 2 **条带（图** 2：A）。**线虫感染后这** 2 **条带发生明显变化，**a **带和** b **带分别在线虫感染后** 48 h **和** 36 h **消失，同时出现一条新的** c **带（图** 2：B）。

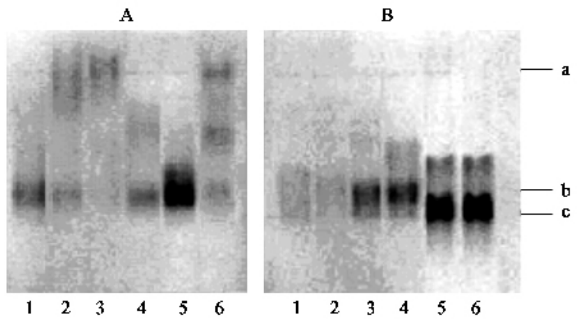

图 2　长角血蜱雌蜱血淋巴酯酶同工酶的 PAGE 图谱

Fig. 2　PAGE of esterases in the hemolymph of *Haemaphysalis longicornis*

A：**对照** 2，**注射** 4 μL **蒸馏水** Control 2, injected with 4 μL distilled water；B：**注射** 4 μL Hb E-6-7 **悬浮液（约** 200 IJs/20 μL） Injected with 4 μL Hb E-6-7 suspension (about 200 IJs/20 μL)；1 ~ 6：**分别表示注射蒸馏水**（A）**或线虫感染**（B）**后** 0、6、12、24、36 **和** 48 h Representing 0, 6, 12, 24, 36 and 48 h after being injected with distilled water (A) or Hb E-6-7 suspension (B), respectively.

3　讨论

昆虫病原线虫对靶标昆虫的致病机理是目前研究的热点问题之一，已有的研究主要集中于侵入途径、宿主组织病变和血淋巴免疫反应等方面（Balcerzak，1992；Mracek *et al*.，1998）。**本实验首次从生化水平研究了线虫对蜱类的致病作用，研究结果显示，**Hb E-6-7 **感染引起长角血蜱雌蜱血淋巴蛋白含量发生显著变化（图** 1）。**感染后** 12 h，**血淋巴蛋白含量显著增加**（92.21 μg/μL），**是宿主血淋巴对外界异物侵入的一种防御反应。已证实宿主昆虫被线虫感染后，血淋巴能产生多种防御反应，主要为宿主吞噬细胞和其他血细胞对线虫携带共生菌产生的抵抗作用，一般在** 3 ~ 12 h **抵抗作用达最大值，**24 h **后共生菌能破坏这种抵抗反应并大量繁殖，进而破坏宿主的主要器官**（Seryczynka，1975）。**长角血蜱雌蜱感染线虫** 24 h **后血淋巴蛋白含量显著减少，可能与线虫及其共生菌在蜱体内大量繁殖有关，因为线虫及其共生菌繁殖要大量消耗宿主蛋白质和脂类等营养物质。**

对昆虫酯酶同工酶的变化进行分析是了解虫体病理变化的重要途径之一。化学农药或其他有毒物质的入侵导致昆虫体内酶活性发生改变（张兴和赵善欢，1992），**甚至引起酶结构的变化**（Jordao *et al*.，1996）。**血淋巴酯酶能分解酯类物质，因此通过测定血淋巴在室温**（24 ~ 26℃）**下分解底物** α-**乙酸萘酯所**

得分解产物所对应的光吸收值可确定酯酶的活性。酯酶活性大小是虫体内脂类代谢的重要标志，酯酶活性越强表明体内脂类物质分解越多。长角血蜱雌蜱感染线虫后，血淋巴酯酶活性随感染后时间推移发生变化，24 h、36 h 和 48 h 的酯酶活性显著高于对照组。线虫感染 24 h 后蜱酯酶活性的显著增加，推断可能有 3 种原因：线虫及其共生菌为适应自身繁殖所引起的蜱体内的反应；线虫感染后，蜱自身的一种防御反应；线虫共生菌分泌的一种胞外酶——酯酶进入宿主血淋巴，使血淋巴中酯酶活性显著增加。确切原因还有待进一步研究证实。

分析 PAGE 图谱发现，虽然长角血蜱雌蜱酯酶同工酶图谱较为复杂，且随时间发生变化，但 a 带和 b 带较稳定（图 2：A），因此本研究主要分析了线虫感染对这 2 条带的影响。Hb E-6-7 感染使雌蜱血淋巴酯酶条带发生了明显变化，表现为条带的消失和增加。这可能是线虫及其共生菌影响了血淋巴中某些酯酶结合位点上的变化、基因编码出现错位或氨基酸构象发生了变化，表现在电泳分离时酶带的减少或增加（Jordao *et al*.，1996）。

参考文献（References）

Abuhatab M，Selvan S，Gaugler R，1995. Role of proteases in penetration of insect gut by the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri* （Nematoda：Steinernematidae）. *J. Invertebr. Pathol.*，66：125－130.

Balcerzak M，1992. Comparative studies on parasitism，caused by entomogenous nematodes *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora*：effects on immune responses of the host insect. *Acta Parasitologica Polonica*，37（1）：29－35.

Bradford MM，1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*，72：248－254.

Forst S，Dowds B，Boemare N，Stackebrandt E，1997. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.：bugs that kill bugs. *Annu. Rev. Microbiol.*，51：47－72.

Gao ZH，Yang XL，Liu JZ，Jian H，2004. Virulence of entomopathogenic nematodes （Steinernematidae and Heterorhabditidae） to female ticks of *Haemaphysalis longicornis* Neumann （Acari：Ixodidae）. *Acta Entomol. Sin.*，47（1）：20－24. ［高志华，杨小龙，刘敬泽，简恒，2004. 昆虫病原线虫斯氏线虫和异小杆线虫对长角血蜱雌蜱的致病力. 昆虫学报，47（1）：20－24］

Hill DE，1998. Entomopathogenic nematodes as control agents of developmental stages of the black-legged tick，*Ixodes scapularis*. *J. Parasitol.*，84：1 124－1 127.

Jordao BP，Terra WR，Ribeiro AF，Lehane MJ，Ferreira C，1996. Trypsin secretion in *Musca domestica* larval midguts：A biochemical and immunocytochemical study. *Insect Biochem. Mol. Biol.*，26（4）：337－346.

Kaya HK，Gaugler R，1993. Entomopathogenic nematodes. *Annu. Rev. Entomol.*，38：181－206.

Mracek Z，Hanzal R，Kodrik D，1998. Sites of penetration of juvenile Steinernematidae and Heterorhabditidae （Nematoda） into the larvae of *Galleria mellonella* （Lepidoptera）. *J. Invertebr. Pathol.*，52（3）：477－478.

Narayanan K，Gopalkrishnana C，1987. Effect of entomogenus nematode *Steinernema feltiae* to the pre-pupae，pupae and adult of *Spodoptera litura*. *Indian J. Nematol.*，70：273－276.

Patel MC，Vyas RV，1995. Efficacy of *Steinernema glaseri* against *Helicoverpa armigera* on chickpea in posts. *Int. Chickpea News Lett.*，2：39－40.

Samish M，Glazer I，1991. Killing ticks with parasitic nematodes of insects. *J. Invertebr. Pathol.*，58：281－282.

Seryczynska H，1975. Toxicity of *Achromobacter nematophilus* Poinar *et* Thomas cell suspensions against *Leptinotarsa decemlineata* Say. *Bulletin of the Polish Academy of Sciences*，23：347－350.

Vyas RV，Yadav DN，1993. *Steinernema glaseri* （Steiner） Travassos，a biological control agent of root grubs *Holotrichia consanguinea* Blanchard. *Pakistan Journal of Nematology*，11（1）：41－44.

Zhang X，Zhao SH，1992. Effects of toosendanin on several enzyme systems of the cabbage worm *Pieris rapae* L. *Acta Entomol. Sin.*，35（2）：171－177. ［张兴，赵善欢，1992. 川楝素对菜粉蝶体内几种酶系活性的影响. 昆虫学报，35（2）：171－177］

Zhioua E，Lebrun RA，Ginsberg HS，Aeschlimann A，1995. Pathogenicity of *Steinernema carpocapsae* and *S. glaseri* （Nematoda：Steinernematidae） to *Ixodes scapularis* （Acari：Ixodidae）. *J. Med. Entomol.*，32：900－905.

（责任编辑：黄玲巧）